

COMPOSITE NANOSPHERES AND THEIR CONJUGATES WITH BIOMOLECULES

Publication number: JP2003513093 (T)

Publication date: 2003-04-08

Inventor(s):

Applicant(s):

Classification:

- international: *G01N33/545; A61K9/51; A61K31/7088; A61K45/00; A61K47/02; A61K47/04; A61K47/32; A61K47/48; A61K48/00; A61P43/00; C09D11/00; G01N33/543; G01N33/544; A61K9/51; A61K31/7088; A61K45/00; A61K47/02; A61K47/32; A61K47/48; A61K48/00; A61P43/00; C09D11/00; G01N33/543; (IPC1-7): C09D11/00; A61K9/51; A61K31/7088; A61K45/00; A61K47/02; A61K47/04; A61K47/32; A61K47/48; A61K48/00; A61P43/00; G01N33/545*

- European: G01N33/543D4D

Application number: JP20010535057T 20001106

Priority number(s): FR19990014194 19991105; WO2000FR03085 20001106

Also published as:

 WO0133223 (A1)
 US6866838 (B1)
 FR2800635 (A1)
 ES2220560 (T3)
 EP1226438 (A1)

[more >>](#)

Abstract not available for JP 2003513093 (T)

Abstract of corresponding document: **WO 0133223 (A1)**

The invention concerns composite nanospheres having a diameter ranging between about 50 and 1000 nm plus or minus 5 %, preferably between about 100 and 500 nm plus or minus 5 % and advantageously between 100 and 200 nm plus or minus 5 %, and comprising an essentially liquid core consisting of an organic phase and inorganic nanoparticles, distributed inside the organic phase, and a skin consisting of at least a hydrophilic polymer derived from the polymerisation of at least one water soluble monomer, in particular N-alkylacrylamide or a N-N-dialkylacrylamide; conjugates derived from said nanospheres; their preparation methods and their uses.

.....
Data supplied from the **esp@cenet** database — Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2003-513093

(P2003-513093A)

(43) 公表日 平成15年4月8日 (2003.4.8)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テマコード [*] (参考)
A 6 1 K 9/51		A 6 1 K 9/51	4 C 0 7 6
31/7088		31/7088	4 C 0 8 4
45/00		45/00	4 C 0 8 6
47/02		47/02	4 J 0 3 9
47/04		47/04	
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 32 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-535057(P2001-535057)
(86) (22) 出願日 平成12年11月6日 (2000.11.6)
(85) 翻訳文提出日 平成14年5月7日 (2002.5.7)
(86) 国際出願番号 P C T / F R 0 0 / 0 3 0 8 5
(87) 国際公開番号 W O 0 1 / 0 3 3 2 2 3
(87) 国際公開日 平成13年5月10日 (2001.5.10)
(31) 優先権主張番号 9 9 / 1 4 1 9 4
(32) 優先日 平成11年11月5日 (1999.11.5)
(33) 優先権主張国 フランス (F R)

(71) 出願人 ベーイーオー・メリュー
フランス・69280・マルスィー・レトワ
ル・シュマン・ドゥ・ローム (番地なし)
(71) 出願人 サントル・ナショナル・ドゥ・ラ・レシエ
ルシュ・サイエンティフィーク
フランス・F-75794・パリ・セデック
ス・16・リュ・ミシエール・アンジュ・3
(72) 発明者 オリヴィエ・モンダン・モンヴァル
フランス・F-33000・ボルドー・リュ・
ブラシュ・116
(74) 代理人 弁理士 志賀 正武 (外7名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 複合ナノスフェアおよびそれらの生体分子との複合体

(57) 【要約】

約50から1000nmプラスまたはマイナス5%の間、好ましくは約100から500nmプラスまたはマイナス5%の間、有利には100から200nmプラスまたはマイナス5%の間の直径を有し、有機相と、有機相の内部に均質に配置された無機ナノ粒子とからなる必須に液体であるコア、および特にN-アルキルアクリルアミド、またはN,N-ジアルキルアクリルアミドである、少なくとも一つの水溶性モノマーの重合から由来する少なくとも一つの親水性ポリマーからなるエンベロープを含むことを特徴とする複合ナノスフェア。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 約50から1000nmプラスまたはマイナス5%の間、好ましくは約100から500nmプラスまたはマイナス5%の間、有利には100から200nmプラスまたはマイナス5%の間の直径を有し、

— 有機相と、有機相の内部に配置された無機ナノ粒子とからなる必須に液体であるコア、および

— 特にN-アルキルアクリルアミド、またはN,N-ジアルキルアクリルアミドである、少なくとも一つの水溶性モノマーの重合から由来する少なくとも一つの親水性ポリマーからなるエンベロープ

を含むことを特徴とする複合ナノスフェア。

【請求項2】 前記水溶性モノマーが、N-イソプロピルアクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド、N-メチル-N-n-プロピルアクリルアミドから選択されることを特徴とする、請求項1記載の複合ナノ粒子。

【請求項3】 必須に液体であるコアが、以下のもの：

(i) 5から12の炭素原子を含む化合物から選択される脂肪族または環状炭化水素、それらの異性体、およびそれらの混合物；

(ii) 鉄、チタン、コバルト、亜鉛、銅、マンガン、ニッケルの金属酸化物；マグネタイト；ヘマタイト、マンガン、ニッケルおよびマンガン-亜鉛フェライトのようなフェライト；コバルト、ニッケルの合金；ゼオライト；タルク；ベントナイトおよびカオリンのようなクレー；アルミナ；シリカ；グラファイト；カーボンブラックまたは他の無機材料から選択される無機ナノ粒子

を含むことを特徴とする、請求項1記載の複合ナノスフェア。

【請求項4】 前記ナノ粒子が、鉄、チタン、コバルト、亜鉛、銅、マンガン、ニッケルの金属酸化物；マグネタイト；ヘマタイト；マンガン、ニッケル、マンガン-亜鉛のフェライトのようなフェライト；コバルト、ニッケルの合金から選択されることを特徴とする、請求項3記載の複合ナノスフェア。

【請求項5】 前記コアが、蛍光性、発光性または放射性マーカーのようなマーカーをさらに含むことを特徴とする、請求項3記載の複合ナノスフェア。

【請求項6】 前記炭化水素が、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン、およびドデカンから選択されることを特徴とする、請求項3記載の複合ナノスフェア。

【請求項7】 前記無機ナノ粒子が、複合ナノスフェアの全重量に対して5から95%、好ましくは10から90%、より好ましくは20から80%、有利には50から80%の重量を占めることを特徴とする、請求項1から6のいずれか一項記載の複合ナノスフェア。

【請求項8】 前記エンベロープが、前記エンベロープの外層を構成する請求項1または2記載の親水性ポリマーと、エンベロープの外層と必須に液体であるコアとの間の界面に配置される前記エンベロープの内層を構成する疎水性ポリマーとを含むことを特徴とする、請求項1から7のいずれか一項記載の複合ナノスフェア。

【請求項9】 前記疎水性ポリマーが、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、tert-ブチルスチレン、ビニルトルエンのような水中で不溶性であるビニル芳香族モノマーのホモポリマー、並びにこれらのモノマーと、互いのおよび／またはアルキル基が3から10の炭素原子を含むアルキルアクリレートおよびアルキルメタクリレート、および4または5の炭素原子を有するエチレン性酸と1から8の炭素原子を有するアルキルとのエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体、ジエン化合物のような他のコモノマーとのコポリマーから選択されることを特徴とする、請求項8記載の複合ナノスフェア。

【請求項10】 前記エンベロープの表面で、少なくとも一つのリガンドと反応可能である、カルボキシル、アミン、チオール、アルデヒド、ヒドロキシル、トシル、またはヒドラジン基のような反応性官能基をさらに示すことを特徴とする、請求項1から9のいずれか一項記載の複合ナノ粒子。

【請求項11】 抗体、抗体断片、タンパク質、ポリペプチド、酵素、ポリヌクレオチド、プローブ、プライマー、核酸断片 およびビオチンから選択される少なくとも一つのリガンドに結合されていることを特徴とする、請求項10記

載の複合ナノ粒子から由来する複合体。

【請求項12】 とりわけ請求項1から10のいずれか一項記載の少なくとも一つのナノスフェア、または請求項11記載の複合体を含む試薬。

【請求項13】 とりわけ請求項11記載の試薬を含む診断用組成物。

【請求項14】 診断試験における、請求項11記載の試薬または請求項12記載の組成物の使用。

【請求項15】 医薬物質、アンチセンスプローブ、遺伝子修復試薬、または治療上興味ある遺伝子、タンパク質の活性をブロックまたは阻害する薬剤から選択される少なくとも一つのリガンドに結合されていることを特徴とする、請求項1から9のいずれか一項記載の複合ナノスフェアから由来する複合体。

【請求項16】 とりわけ請求項15記載の複合体を含むことを特徴とする、治療用または予防用組成物。

【請求項17】 治療用または予防用組成物の調製のための、請求項15記載の複合体の使用。

【請求項18】 ケージ分子、キレート剤、および触媒から選択される少なくとも一つのリガンドに結合されていることを特徴とする、請求項1から8のいずれか一項記載の複合ナノスフェアから由来する複合体。

【請求項19】 (i)二つの混和しない相からなる安定な等分散性開始エマルジョンを入手し、ここで疎水性A相は、界面活性剤を含む有機相に均一に分散した無機ナノ粒子を含む小滴からなり、前記A相は、親水性B相に分散しており、(ii)少なくとも一つの水溶性モノマー、少なくとも一つの水溶性架橋剤、および少なくとも一つの水溶性重合開始剤を、親水性B相に導入し、水溶性モノマーを、架橋剤と開始剤の存在下で重合させる、複合ナノスフェアの調製方法。

【請求項20】 工程(ii)の前に、少なくとも一つの水溶性モノマーと第一の重合開始剤を親水性相内に導入し、もし必要であれば、第二の重合開始剤を工程(ii)で導入する、請求項19記載の方法。

【請求項21】 前記第一の水溶性重合開始剤、および任意に第二の重合開始剤が、水溶性および疎水性モノマーのそれぞれの添加と同時に、または水溶性および疎水性モノマーのそれぞれの添加の前または後にいずれかで、親水性相

内に導入される、請求項19または20記載の方法。

【請求項22】 前記水溶性開始剤が、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウムおよび過硫酸アンモニウムのような、過硫酸塩と称されるパーオキシジスルファート塩；ヒドロ過酸化クメンのようなヒドロ過酸化物；過酸化水素；塩酸2,2'-アゾビスアミジノプロパン、ジメチル2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオナート)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、および2,2'-アゾビス(2-シアノプロパノール)から選択される、請求項19から21のいずれか一項記載の方法。

【請求項23】 前記水溶性モノマーが、特にN-イソプロピルアクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド、N-メチル-N-n-プロピルアクリルアミドといったN-アルキルアクリルアミドおよびN-N-ジアルキルアクリルアミドから選択され、前記疎水性モノマーが、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、tert-ブチルスチレン、ビニルトルエンのような水中で不溶性であるビニル芳香族モノマー、並びにこれらのモノマーと、互いのおよび／またはアルキル基が3から10の炭素原子を含むアルキルアクリレートおよびアルキルメタクリレート、および4または5の炭素原子を有するエチレン性酸と1から8の炭素原子を有するアルキルとのエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体、ジエン化合物のような他のモノマーとのコポリマーから選択されることを特徴とする、請求項19から21のいずれか一項記載の方法。

【請求項24】 前記疎水性モノマーが、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、tert-ブチルスチレン、ビニルトルエンのような水中で不溶性であるビニル芳香族モノマー、並びにこれらのモノマーと、互いのおよび／またはアルキル基が3から10の炭素原子を含むアルキルアクリレートおよびアルキルメタクリレート、および4または5の炭素原子を有するエチレン性酸と1から8の炭素原子を有するアルキルとのエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体、ジエン化合物のような他のモノマーとのコポリマーから選択されることを特徴とする、請求項20記載の方法。

【請求項25】 前記水溶性架橋剤が、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBA)およびエチレングリコールジメタクリレートから選択される、請求項19から24のいずれか一項記載の方法。

【請求項26】 前記疎水性有機A相が、5から12の炭素原子を含む化合物から選択される脂肪族または環状炭化水素、それらの異性体、およびそれらの混合物を含む相であり、特にペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン、ドデカンから選択され、B相が、水性相、特に水である、請求項19から26のいずれか一項記載の方法。

【請求項27】 前記重合が、重合開始剤の存在下で、約60℃から約90℃まで、好ましくは約70℃まで温度を上昇させることによって、またはUV光線若しくはレーザービームのような光線を使用して光化学的に実施されることを特徴とする、請求項19から26のいずれか一項記載の方法。

【発明の詳細な説明】**【0001】****【発明の属する技術分野および従来の技術】**

マイクロカプセル化は、少なくとも一つのポリマー層で被覆された小さな固体粒子を生産するために使用される方法である。この方法は、有機ポリマーの層で被覆された無機粉体を生産するために特に使用されている。そのようなシステムは、個々の構成成分の特性の合計とは異なる特性、特により優れた機械的特性を有すると想定される。マイクロカプセル化法は、顔料、インク、プラスチックおよび塗料の調製の分野で特に使用されている。カプセル化粒子と顔料の最も重要な応用の一つは、エマルション塗料の分野で見出される。しかしながら、カプセル化によって得られた無機粒子が磁化できる場合、そのことは例えば、診断試験における使用のためのカプセル化粒子を有するタンパク質または抗体の結合によって、生物学の分野で特定の路を開く。そのような粒子はまた、生化学的分離の方法においても使用される。一般的にカプセル化粒子は、生物学的操作、診断および医薬の分野における支持体、ベクターまたはビヒクルとして興味を有されている。この効果のために、それらは生物学的マクロ分子のための固体の支持体として、医学的診断において使用されている。

【0002】

特に特異的な相互作用のための大きな表面を有し、抗体または抗体断片、タンパク質、ポリペプチド、ポリヌクレオチド、核酸、核酸断片、酵素のような生物学的分子、または触媒、医薬、ケージ分子若しくはキレーターのような化学的分子といった他の分子と反応可能な官能基をその表面で導入するために容易に化学的に修飾できるため、コロイド状粒子は、チューブまたはプレートのような従来の固体の支持体に対していくつかの利点を示す。

【0003】

コロイド状粒子の中で、磁性ラテックスは、分析の分野で非常に興味を引きつけており、例えば抗原、抗体、生化学的分子、核酸等のような分析物を分離および／または検出するための手段として使用される。

【0004】

ポリマー状／磁性タイプの複合粒子は、通常はサイズの基準で三つのカテゴリーに分類される：50nm未満の直径を有する小粒子、 $2\mu\text{m}$ より大きい直径を有する大粒子、および50から1000nmの間の直径を有する中間粒子。

【0005】

しかしながら、それらをとくに診断の応用のための良好な候補として考慮するために、それらは特定の基準に適合しなければならない。形態学的な観点から、それらは比較的球状であることが好ましく、磁性の負荷がポリマーマトリックスにおいて比較的均一に配置されることが好ましい。それらは磁場の作用の下で不可逆的な態様で凝集してはならず、そのことはそれらが容易に、迅速に、且つ可逆的に再分散できることを意味する。同様に、それらは沈降の現象を減少するために、比較的低密度を有するべきである。有利にはそれらは、狭い粒子サイズ分布を有するべきである。前記粒子は、単分散性(monodisperse)または等分散性(isodisperse)とも称される。

【0006】

かくして、そのサイズおよび密度のため、液相中の懸濁物における大きな磁性粒子は、迅速に沈降する傾向を有する。さらに、それらは永久に磁化されているようであるため、磁場かけられた後に凝集を形成する傾向にある。残余磁化の用語が使用される。それ故それらは良好な候補を構成しない。

【0007】

逆に、小さな磁性粒子は、そのブラウン運動のため懸濁物中に維持される傾向にあり、特にもし適用された磁場が比較的弱いのであれば、磁石によって誘引するのが困難であるかまたは全く誘引されない。それ故それらは、前述の使用にあまり適していない。

【0008】

それ故、上述の欠点を克服し、前述の確立された基準に特に適合する、50から1000nmの間に中間的サイズを有する、ポリマー状／磁性タイプの複合粒子を生産することが明らかに有利である。しかしながら、本発明は、以下に記載されるような複合磁化可能粒子に制限されない。

【0009】

Dynal（登録商標）粒子が挙げられる。これらの粒子は、ポリスチレンと酸化鉄の多孔性コアからなるミクロスフェアであり、酸化鉄は、ポリスチレンと多孔性ミクロスフェアの酸化鉄をカプセル化する別のポリマーからなるエンベロープの表面で利用可能な孔の中に浸透することによって沈着している。それらはそれぞれ $2.8\mu\text{m}$ （粒子M280）および $4.5\mu\text{m}$ （粒子M450）の直径を有し、比較的均一なサイズである。それ故それらは、等分散性粒子として考慮されるが、その大きなサイズのため、特に沈降の現象という前述の欠点を示す。さらにそれらの比表面積は小さい。

【0010】

特許出願EP 0 390 634は、50から10000nmのオーダーの直径を有し、磁化可能粒子からなる固体コアと、少なくとも一つのビニル芳香族モノマーと、ビニル芳香族モノマーに可溶性で前記モノマーと架橋可能な少なくとも一つのポリエチレン性不飽和乳化ポリマーとから由来する疎水性コポリマーからなる表面を含む、疎水性架橋化ビニル芳香族ポリマーの磁化可能複合ミクロスフェアを記載する。しかしながら、それらはサイズの条件に適合できるが、コアの内部に配置される磁性の負荷の均一な分布を有しないという欠点を有する。さらに、この特許において添付された図面から明らかなように、前記粒子はサイズが不均一である。それ故、それらは、予測されたサイズの粒子のみを選択するように、分画化されなければならない多分散性粒子のセットである。最後に、固体のコアの内部の磁化可能な粒子は、その配向においてランダムで不自然な態様で得られるため、それ故複合ミクロスフェアから生ずる磁性モーメントは、結果として、固体のコアの内部の粒子のランダムな分布と結びついた生成するモーメントの減少を伴う、磁化可能粒子のモーメントの代数的な合計に対応する。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】

以下に記載されるように、本発明の複合ナノスフェアの特徴の一つは、それらが磁性である場合、必須に液体であるコアの内部に分散されたナノ粒子が、生成した磁性モーメントに対して十分に移動可能であり、弱い磁場であっても磁場の作用の下で分離を容易にし、そのことが特許出願EP 0 390 634に記載されたタイ

プの固体のコアを有する磁性粒子と比較して明白な利点を有する。これは特に、磁性ナノ粒子の含量が低い場合に有利である。

【0012】

それ故本発明は、前述の欠点を解消する新規なカプセル化複合ナノ粒子に関する。

【0013】

【課題を解決するための手段】

本発明のカプセル化複合ナノスフェアは、そのコアに、コアの内部に均一に分散された無機材料の搭載を含む；それらはサイズにおいて等分散性であり、特に診断のためのといった生物学の分野、並びに塗料、インク等の調製の分野で多様に使用されることが可能である。

【0014】

本発明の複合ナノスフェアは、約50から1000nmプラスまたはマイナス5%の間、好ましくは約100から500nmプラスまたはマイナス5%の間、有利には100から200nmプラスまたはマイナス5%の間の直径を有し、

— 有機相と、有機相の内部に均質に配置された無機ナノ粒子とからなる必須に液体であるコア、および

— 特にN-アルキルアクリルアミド、N,N-ジアルキルアクリルアミド、とりわけN-イソプロピルアクリルアミド(NIPAM)、N-メチルアクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド、N-メチル-N-n-プロピルアクリルアミドである、少なくとも一つの水溶性モノマーの重合から由来する少なくとも一つの親水性ポリマーからなるエンベロープを含む。

【0015】

プラスまたはマイナス5%は、容量による平均径が、プラスまたはマイナス約5%内に定義されることを意味する。サイズは、光散乱によって測定される。

【0016】

必須に液体であるコアは以下のものを含む：

(i)5から12の炭素原子を含む化合物から選択される脂肪族または環状炭化水素、それらの異性体、およびそれらの混合物。好ましくは前記炭化水素は、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン、およびドデカンから選択され、選択肢の関数としての生産の方法、または選択された炭化水素の重合条件を合わせることは、当業者の能力の範囲内にあると解される。特に重合が高温で実施される場合、反応の段階は、ペンタンのような揮発性炭化水素、および選択された重合開示剤の性質に合わされるべきである；

(ii)鉄、チタン、コバルト、亜鉛、銅、マンガン、ニッケルの金属酸化物；マグネタイト；ヘマタイト、マンガン、ニッケルおよびマンガン-亜鉛フェライトのようなフェライト；コバルト、ニッケルの合金；ゼオライト；タルク；ベントナイトおよびカオリンのようなクレー；アルミナ；シリカ；グラファイト；カーボンブラックまたは他の無機材料から選択される無機ナノ粒子。好ましくは無機材料は、鉄、チタン、コバルト、亜鉛、銅、マンガン、ニッケルの金属酸化物；マグネタイト；ヘマタイト；マンガン、ニッケル、マンガン-亜鉛のフェライトのようなフェライト；コバルト、ニッケルの合金から選択される。

【0017】

かくして規定されたコアは、蛍光性、発光性または放射性マーカーのようなマーカーをさらに含んでも良く、前記マーカーは、以下の実施例1に記載されたようなエマルジョンの調製の間で導入されると解される。

【0018】

無機ナノ粒子は、複合ナノスフェアの全重量に対して5から95%、好ましくは10から90%、より好ましくは20から80%、有利には50から80%の重量を占める。

【0019】

【発明の実施の形態】

本発明の一つの実施態様として、前記エンベロープは、前記エンベロープの外層を構成する前述の親水性ポリマーと、エンベロープの外層と必須に液体であるコアとの間の界面に配置される前記エンベロープの内層を構成する疎水性ポリマーとを含む。

【0020】

疎水性ポリマーは、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、tert-ブチルスチレン、ビニルトルエンのような水中で不溶性であるビニル芳香族モノマーのホモポリマー、並びにこれらのモノマーと、互いのおよび／またはアルキル基が3から10の炭素原子を含むアルキルアクリレートおよびアルキルメタクリレート、および4または5の炭素原子を有するエチレン性酸と1から8の炭素原子を有するアルキルとのエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体、ジエン化合物のような他のコモノマーとのコポリマーから選択される。

【0021】

本発明の複合ナノスフェアは特に、塗料、インク、プラスチックの分野での応用が見出され、それらが官能化されている場合、特に生物学的または生化学的分子の分離のために、診断試験のために、治療用、予防用、または化粧品組成物の調製のために、生物学の各種の分野での応用が見出される。

【0022】

従って、本発明の一つの実施態様として、複合ナノスフェアは、例えば生物学的分子といった分子と相互作用できる官能基をエンベロープの表面で示し、前記官能基は、(i)例えば加水分解または官能基のグラフト化のような化学的処理といった、エンベロープの表面処理、(ii)またはメタクリル酸、アクリル酸、イタコン酸、アミノエチルメタクリレート、アミノプロピルメタクリレートのような、少なくとも一つの官能性モノマーの付加、(iii)またはジメチル2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオナート)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)および2,2'-アゾビス(2-シアノプロパノール)のような、官能性開始剤の付加のいずれかによって提供される。

【0023】

かくして官能化された複合ナノスフェアは、特許出願EP 0 842 194に記載されたプロトコールに従って核酸の濃縮のため、または特許出願W0 99/35500に記載されたプロトコールに従ってタンパク質の濃縮のために使用されても良い。

【0024】

かくして、本発明の複合ナノスフェアは官能化されても良く、エンベロープの

表面で、少なくとも一つのリガンドと反応可能である、カルボキシル、アミン、チオール、ヒドロキシル、トシル、またはヒドラジン基のような反応性官能基を示しても良い。

【0025】

かくして形成された官能化複合ナノスフェアは、例えば抗体、抗体断片、タンパク質、ポリペプチド、酵素、ポリヌクレオチド、プローブ、プライマー、核酸断片のような生物学的分子；化学的ポリマー、医薬物質、ケージ分子、キレート剤、触媒、ビオチンのような化学的分子といったリガンドを固定可能であろう。

【0026】

本発明の主題はまた、上述の少なくとも一つのリガンドに結合された本発明の複合ナノスフェアから由来する複合体と、その使用である。

【0027】

例として、前記複合体は、生物学的サンプル中のタンパク質、抗原、抗体の検出および／または定量のための免疫学的試験において、または生物学的サンプル中の核酸若しくは核酸断片の検出および／または定量のためのプローブ法を使用する試験において使用される。サンプル中の核酸の検出および／または定量のためのプローブの使用は、当業者に周知であり、例としてサンドイッチハイブリダイゼーション法が挙げられる。同様に、本発明の複合体は、例えばPCR（ポリメラーゼ連鎖反応）またはいずれかの他の適切な増幅法によって、サンプル中の核酸増幅反応のための「プライマー運搬試薬」（“primer-carrying agents”）として使用されても良く、かくして生物学的サンプル中の核酸の検出および／または定量が可能である。

【0028】

それ故本発明の主題はまた、とりわけ前記複合ナノスフェアまたは前記複合体を含む、診断試薬および診断用組成物、並びに例えばタンパク質または核酸の濃縮のための分析試験における、または別法として診断試験における、前記試薬の使用である。

【0029】

前記複合体はまた、医薬物質のためのビヒクルまたはベクター、欠損遺伝子修

復試薬、治療におけるアンチセンスプローブのような、遺伝子の発現をブロックまたは阻害可能な薬剤、またはタンパク質の活性をブロックまたは阻害可能な薬剤として、治療または予防の分野での応用が見出され、それによって治療用または予防用組成物において使用できる。

【0030】

かくして本発明の複合体は、適切な且つ製薬学的に許容可能なアジュバントおよび／または希釈液および／または賦形剤と組み合わせて前記複合体を含む、治療用または予防用組成物において医薬物質を運搬可能であり、前記医薬物質は、*in vivo*で放出可能である。製薬学的に許容可能な賦形剤およびアジュバントの定義は、例えばRemington's Pharmaceutical Science 第16版, Mack Publishing Co編に記載されている。

【0031】

本発明の複合体はまた、興味ある少なくとも一つのタンパク質または興味あるタンパク質の断片をコードする治療上興味ある遺伝子を運搬することが可能であり、用語、タンパク質は、最も一般的に使用される定義におけるタンパク質と抗体の両者を意味するように解される。もちろん、そのような複合体は、前記治療上興味ある遺伝子の発現のために必要な構成成分も含む治療用または予防用組成物内に取り込まれる。

【0032】

本発明の複合体はまた、治療用または予防用組成物内に取り込まれた場合、アンチセンスオリゴヌクレオチドまたはプローブの*in vivo*トランスファーのために使用できる。アンチセンス分子は、標的中のmRNAの位置に従ってポリソームの形成および／または機能を阻害することによって、興味ある標的タンパク質の合成を特異的に妨げることが可能である。それ故、アンチセンスオリゴヌクレオチドによる阻害のための標的として翻訳のための開始コドンを取り囲む配列の通常の実験は、開始複合体の形成を妨げるようにデザインされる。アンチセンスオリゴヌクレオチドによる阻害における他のメカニズムは、アンチセンスオリゴヌクレオチド／mRNAハイブリッドを切断するリボヌクレアーゼHの活性化、またはmRNAスプライシング部位を標的に有するアンチセンスオリゴヌクレオチドによるス

プライシング部位での妨害を含む。アンチセンスオリゴヌクレオチドはまた、相補的DNA配列をも有し、それ故三本鎖の形成を通じて転写を妨げることができ、前記アンチセンスオリゴヌクレオチドは、DNA二本鎖の大きな溝におけるHoogsteen水素結合と称されるものを介して結合する。この特定の場合、抗原性オリゴヌクレオチドに対してより正確に参照がなされる。アンチセンスオリゴヌクレオチドは、それらがハイブリダイズするDNAまたはRNA標的に対して厳格に相補的であっても良いが、それらが標的にハイブリダイズすることを条件に、厳格に相補的でなくても良い。同様に、これは、ヌクレオチド内結合において修飾されないまたは修飾されたアンチセンスオリゴヌクレオチドを含んでも良い。全てのこれらの概念は、当業者の一般的知見の一部である。

【0033】

それ故本発明は、とりわけ前述のようなアンチセンスオリゴヌクレオチドのためのベクター複合体を含む治療用組成物に関する。

【0034】

最後に、前記複合体はまた、ケージ分子／クリプタートまたはキレーター／キレート化分子タイプの複合体を形成すること、あるいは化学的応用における触媒のためのビヒクルとして機能することが可能である。

【0035】

本発明の複合ナノスフェアおよび複合体は、以下の実施例に記載されるプロトコルに従って、エマルションの重合を介するカプセル化の方法によって得られ、本発明はまた、そのような調製の方法にも関する。

【0036】

本発明の方法に従って、(i)二つの混和しない相からなる安定な等分散性開始エマルションが入手可能であり、疎水性A相は、界面活性剤を含む有機相に均一に分散した無機ナノ粒子を含む小滴からなり、前記A相は、親水性B相に分散しており、(ii)少なくとも一つの水溶性モノマー、少なくとも一つの水溶性架橋剤、および少なくとも一つの水溶性重合開始剤を、親水性B相に導入し、並びに(iii)水溶性モノマーを、架橋剤と開始剤の存在下で重合させる。

【0037】

本発明の一つの実施態様として、工程(ii)の前に、少なくとも一つの疎水性モノマーと第一の水溶性重合開始剤を親水性相内に導入し、次いで少なくとも水溶性モノマーと、架橋剤と、任意にもし必要であれば、第一の開始剤と同一でもことなっても良い第二の水溶性重合開始剤への添加を実施し、第二の重合開始剤の添加は、もし第一の重合開始剤の量が、組成物に対する完全な重合を達成するのに制限されるまたは不十分である場合にのみ有用であると解される。開始剤の全体の量は、全体のモノマー濃度に対して、1から10mol%の間、好ましくは1から5mol%の間である。

【0038】

水溶性開始剤は、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウムおよび過硫酸アンモニウムのような、過硫酸塩と称されるパーオキシジスルファート塩；ヒドロ過酸化クメンのようなヒドロ過酸化物；過酸化水素；塩酸2,2'-アゾビスアミジノプロパン、ジメチル2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオナート)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、および2,2'-アゾビス(2-シアノプロパノール)から選択される。これらの中で、ジメチル2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオナート)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、および2,2'-アゾビス(2-シアノプロパノール)が官能性開始剤である。過硫酸塩は水溶性開始剤である。熱の作用の下での分解は、ナノスフェアの荷電に向けて寄与する硫酸基を有するアニオンを生産する。過酸化水素は水中で分解し、荷電しないヒドロキシル基を形成する。ヒドロ過酸化物は、特にモノマーからなる水相の両方で可溶性である。ヒドロ過酸化物の分解は、ヒドロキシル基と、使用される過酸化物のタイプに従って相の一方で分布するようになる別の酸素化基を生産する。ヒドロ過酸化クメンは、スチレンの重合の場合、モノマーの粒子と水の間の界面で分解するように想定され、ヒドロキシル基が水相中に侵入し、非極性基が粒子に向けて分散する。本発明の複合ナノスフェアの、または生成した複合体のカチオン特性またはアニオン特性は、開始剤のカチオン性またはアニオン性に依存するであろう。

【0039】

開始剤は、モノマーの導入と同時に、またはそれらの導入の前に、または別法としてそれらの導入に引き続きのいずれかで、親水性相内に導入される。

【0040】

水溶性モノマーおよび疎水性モノマーは、前述の定義に対応する。

【0041】

水溶性架橋剤は、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBA)およびエチレングリコールジメタクリレートから選択される。

【0042】

疎水性有機A相は、5から12の炭素原子を含む化合物から選択される脂肪族または環状炭化水素、それらの異性体、およびそれらの混合物を含む相である。特に前記炭化水素は、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン、およびドデカンから選択され、重合が温度を上昇させることによって実施された場合、当業者はペンタンのような揮発性構成成分、および選択される重合開始剤の性質に反応工程を合わせるべきである。B相は、水のような水性相である。

【0043】

重合は好ましくは、重合開始剤の存在下で、約60℃から約90℃まで、好ましくは約70℃まで温度を上昇させることによって実施され、重合条件は、選択された開始剤の性質に従って当業者により決定されるであろう；またはUV光線若しくはレーザービームまたは他のエネルギー源のような光線を使用して光化学的に実施される。

【0044】

【実施例】

実施例1

安定で且つ等分散性の開始エマルジョンを、この実施例に記載されたプロトコールのそれぞれに従って調製した。

【0045】

(i)一次エマルジョンを、コロイドミル(Ika(登録商標))を使用して剪断しながら、オクタン中に45重量%の酸化鉄からなる分散相を、水中に50重量%の濃度でドデシル硫酸ナトリウムからなる連続相中に、80重量%の鉄流体を含む分画が得られるまで段階的に取り込ませることによって、乳化法を使用して調製した

。かくして規定された混合物を、事前に決定された剪断速度でPG398-type Couetteで分画した。かくして調製された一次エマルションは、小滴の直径の広範囲の分布によって特徴付けされる多分散性エマルションであり、それをサイズにおいて等分散性である開始エマルションの生産のために連続的磁性ソーティングによって処理する。

【0046】

(ii)一次エマルションを、オクタン、73重量%の酸化鉄、およびモノグリセロールまたはポリグリセロールポリリシノールアートタイプの脂溶性界面活性剤（1から10重量%）からなる分散相を、テルギトールNP10-typeの界面活性剤（31重量%）からなる連続相に、へらを使用して迅速に添加することによって、乳化法を使用して調製した。かくして規定された混合物を、事前に決定された剪断速度でPG398-type Couetteで分画した。かくして調製された一次エマルションは、小滴の直径の低分布によって特徴付けされる比較的等分散性のエマルションであり、それをサイズにおいて等分散性である開始エマルションの生産のために連続的磁性ソーティングによって処理する。

【0047】

実施例2

20mlのエマルション（0.8倍の臨界ミセル濃度(CMC)でドデシル硫酸ナトリウム(SDS)と水中に分散された1重量%）を、重合のため25ml丸底フラスコ内に注ぐ。9時間空気を排出させるために、窒素下でバブリングによって溶液を脱気する。0.4mlの水中の24 μ lのスチレンモノマーと4.3mgの可溶化過硫酸カリウム開始剤を導入し、混合物を2時間攪拌し続ける。次いで20分攪拌しながら、温度を70℃に上昇させる。混合物(1mlの水中に可溶化した280mgのN-イソプロピルアクリルアミド、0.4mlの水中に可溶化した11mgのメチレンビスアクリルアミド、30 μ lのメタクリル酸)を、30分に亘り導入する。重合を窒素雰囲気下で70℃の温度で12時間実施する。官能基の存在を、メタクリル酸によって確認する。

【0048】

最終磁性ラテックスは、20℃で以下の特徴を有する：光散乱によって測定される直径は、192nmプラスまたはマイナス5nmである。酸化鉄レベルは約70%であ

る。

【0049】

実施例3：

50mlのエマルション（1倍のCMCでSDSと水中に分散した0.7%）を、50mlの重合反応器に注ぐ。溶液を、3時間30分窒素下でのバブリングによって脱気する。7 μ lのスチレンモノマーと2 μ lのメタクリル酸を導入し、混合物を20分間攪拌し続ける。0.1mlの水中に可溶化した開始剤（過硫酸カリウム、2mg）を導入し、溶液を10分間ホモジェナイズする。次いで25分攪拌しながら、温度を70℃に上昇させる。以下の混合物（0.5mlの水中に可溶化した80mgのN-イソプロピルアクリルアミド、6 μ lのメタクリル酸、4 μ lのスチレン）を、以下のように導入する：

【0050】

200 μ lの混合物の導入、および200 μ lの混合物の導入に引き続き30分のホモジェナイゼーション、および30分のホモジェナイゼーションの後に混合物の他の構成成分の導入。窒素雰囲気下で70℃の温度で、16時間300rpmで攪拌しながら重合反応を実施する。官能基の存在を、メタクリル酸によって確認する。

【0051】

最終磁性ラテックスは、以下の特徴を有する：光散乱によって測定される、20℃で187nmプラスまたはマイナス5nmの直径、および約70%の酸化鉄レベル。pH10で-50mVおよびpH4.5で0mVのゼータ電位。

【0052】

実施例4：

15mlのエマルション（トリトンX405において1倍のCMCで水中に分散した0.7%）を、重合のため50mlの丸底フラスコ内に導入する。このエマルションを、5時間窒素下でのバブリングによって事前に脱気する。0.2mlの水中に可溶化した7 μ lのスチレンモノマーと2mgのN-(3-アミノプロピル)メタクリルアミドを導入する。混合物を25分ホモジェナイズし、その後0.2mlの水中に可溶化した開始剤である2mgの塩酸2,2'-アゾビスアミジノプロパンを導入する。20分のホモジェナイズの後、温度を25分70℃に上昇し、以下の混合物（0.5mlの水中に可溶化した80mgのN-イソプロピルアクリルアミド、0.1mlの水中に可溶化した2mgのメチレンビス

アクリルアミド、0.1mlの水中に可溶化した6mgのN-(3-アミノプロピル)メタクリルアミド)を、以下の態様で導入する：

【0053】

0.2mlの混合物の導入、20分ホモジェナイゼーション、0.2mlの混合物の導入、30分ホモジェナイゼーション、混合物の残りの導入。

【0054】

窒素雰囲気下で70℃の温度で、16時間300rpmで攪拌しながら重合反応を実施する。アミン基の存在を、N-(3-アミノプロピル)メタクリルアミドによって確認する。

【0055】

最終磁性ラテックスは、以下の特徴を有する：光散乱によって測定される、20℃で187nmプラスまたはマイナス5nmの直径、および70%のオーダーの酸化鉄レベル。pH4で+50mVおよびpH10で-50mVのゼータ電位。

【0056】

実施例5：

60μlのTween 20 (1%)、636μlのリン酸バッファー(pH6.9で10mM)、60μlの二塩酸N-(3-ジメチルアミノプロピル)-N'-エチルカルボジイミド(25mg/ml)、156μlのN-ヒドロキシスルホスクシンイミド(25mg/ml)、およびストレプトタビジン(1mg/mlで48μl)を、前述のように得られた240μlの3%での磁性ラテックスに連続的に添加する。

【0057】

混合物を室温で1時間インキュベートし、次いで磁場を適用することによって粒子を濃縮し、次いで界面活性剤を含むバッファー中に再分散する(10mMリン酸、pH6.9+0.05% Tween 20)。

【0058】

338nmol/mlの濃度で5753g/molの重量を有する、9.9μlの17マーのビオチン化オリゴヌクレオチド(ODN)を、ポジティブコントロールを構成するために、事前に合成された400μlのストレプトタビジン被覆化粒子に加える。20μlの17マーの非ビオチン化且つ非アミノ化オリゴヌクレオチド(重量：167nmol/mlの濃度で64

52g/mol) を、ネガティブコントロールを構成するために、事前に合成された400 μ lのストレプトタビジン被膜化粒子に加える。

【0059】

二つのコントロールを、室温で30分インキュベートし、3倍に分離させ、一度目に塩基性バッファーで(10mMリン酸、pH9.9+SDS、5倍の臨界ミセル濃度)、二度目に中性pHでのバッファーで(10mMリン酸、pH6.9+0.05% Tween 20)、および三度目にサケ精子DNAを含む280 μ lのPEG中に再分散する。

【0060】

両者の場合で、セイヨウワサビペルオキシダーゼでラベルされたポジティブコントロールのODNに相補的な20 μ lのODN (17マー、9nmol/mlの濃度) を加える。

【0061】

二つのコントロールを、室温で1時間再びインキュベートし、さらに分離し、サケ精子DNAを含む400 μ lのPEG中に再び分散した。

【0062】

50 μ lのオルト-フェニレンジアミンを、50 μ lの粒子に加える。酵素反応を5分間実施し、50 μ lの硫酸(1M)の添加によって停止する。

【0063】

粒子を上清から分離し、後者を492と630nmでAxia Microreader (登録商標、bioMerieux) 装置での比色法によってアッセイする。

【0064】

ポジティブコントロールは、20000D単位の光学密度を提供する一方、ネガティブコントロールは、10000D単位の密度を提供する。

【0065】

前述の実施例における重合の前後で観察されたサイズの変動は、以下の二つの現象の組み合わせに寄与する：a)有機相の部分の考え得る蒸発、およびb)一つの例から別のものへの重合の変換。重合の後の酸化鉄レベルは、重合の前に使用されたエマルションにおける大きさと実質的に同じオーダーを有する。

【手続補正書】特許協力条約第34条補正の翻訳文提出書

【提出日】平成13年12月17日(2001.12.17)

【手続補正1】

【補正対象書類名】明細書

【補正対象項目名】特許請求の範囲

【補正方法】変更

【補正の内容】

【特許請求の範囲】

【請求項1】 約50から1000nmプラスまたはマイナス5%の間の直径を有し、
ー 有機相と、有機相の内部に配置された無機ナノ粒子とからなる必須に液体であるコア、および
ー 特にN-アルキルアクリルアミド、またはN,N-ジアルキルアクリルアミドである、少なくとも一つの水溶性モノマーの重合から由来する少なくとも一つの親水性ポリマーからなるエンベロープ
を含むことを特徴とする複合ナノスフェア。

【請求項2】 約100から500nmプラスまたはマイナス5%の間の直径を有することを特徴とする、請求項1記載の複合ナノスフェア。

【請求項3】 有利には100から200nmプラスまたはマイナス5%の間の直径を有することを特徴とする、請求項1記載の複合ナノスフェア。

【請求項4】 前記水溶性モノマーが、N-イソプロピルアクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-メチル-N-イソプロピルアクリルアミド、N-メチル-N-n-プロピルアクリルアミドから選択されることを特徴とする、請求項1から3のいずれか一項記載の複合ナノ粒子。

【請求項5】 液体であるコアが、以下のもの：

- (i)5から12の炭素原子を含む化合物から選択される脂肪族または環状炭化水素、それらの異性体、およびそれらの混合物；
- (ii)鉄、チタン、コバルト、亜鉛、銅、マンガン、ニッケルの金属酸化物；マグ

ネタイト；ヘマタイト、マンガン、ニッケルおよびマンガン-亜鉛フェライトのようなフェライト；コバルト、ニッケルの合金；ゼオライト；タルク；ベントナイトおよびカオリンのようなクレー；アルミナ；シリカ；グラファイト；カーボンブラックまたは他の無機材料から選択される無機ナノ粒子を含むことを特徴とする、請求項1から4のいずれか一項記載の複合ナノスフェア。

【請求項6】 前記ナノ粒子が、鉄、チタン、コバルト、亜鉛、銅、マンガン、ニッケルの金属酸化物；マグネタイト；ヘマタイト；マンガン、ニッケル、マンガン-亜鉛のフェライトのようなフェライト；コバルト、ニッケルの合金から選択されることを特徴とする、請求項5記載の複合ナノスフェア。

【請求項7】 前記コアが、蛍光性、発光性または放射性マーカーのようなマーカーをさらに含むことを特徴とする、請求項5記載の複合ナノスフェア。

【請求項8】 前記炭化水素が、ペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン、およびドデカンから選択されることを特徴とする、請求項5記載の複合ナノスフェア。

【請求項9】 前記無機ナノ粒子が、複合ナノスフェアの全重量に対して5から95%の重量を占めることを特徴とする、請求項1から8のいずれか一項記載の複合ナノスフェア。

【請求項10】 前記無機ナノ粒子が、複合ナノスフェアの全重量に対して10から90%の重量を占めることを特徴とする、請求項9記載の複合ナノスフェア。

【請求項11】 前記無機ナノ粒子が、複合ナノスフェアの全重量に対して20から80%の重量を占めることを特徴とする、請求項9記載の複合ナノスフェア。

【請求項12】 前記無機ナノ粒子が、複合ナノスフェアの全重量に対して50から80%の重量を占めることを特徴とする、請求項9記載の複合ナノスフェア。

【請求項13】 前記エンベロープが、前記エンベロープの外層を構成する請求項1または4記載の親水性ポリマーと、エンベロープの外層と必須に液体で

あるコアとの間の界面に配置される前記エンベロープの内層を構成する疎水性ポリマーとを含むことを特徴とする、請求項1から12のいずれか一項記載の複合ナノスフェア。

【請求項14】 前記疎水性ポリマーが、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、tert-ブチルスチレン、ビニルトルエンのような水中で不溶性であるビニル芳香族モノマーのホモポリマー、並びにこれらのモノマーと、互いのおよび／またはアルキル基が3から10の炭素原子を含むアルキルアクリレートおよびアルキルメタクリレート、および4または5の炭素原子を有するエチレン性酸と1から8の炭素原子を有するアルキルとのエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体、ジエン化合物のような他のコモノマーとのコポリマーから選択されることを特徴とする、請求項13記載の複合ナノスフェア。

【請求項15】 前記エンベロープの表面で、少なくとも一つのリガンドと反応可能な、カルボキシル、アミノ、チオール、アルデヒド、ヒドロキシル、トシル、またはヒドラジン基のような反応性官能基をさらに示すことを特徴とする、請求項1から14のいずれか一項記載の複合ナノスフェア。

【請求項16】 抗体、抗体断片、タンパク質、ポリペプチド、酵素、ポリヌクレオチド、プローブ、プライマー、核酸断片、およびビオチンから選択される少なくとも一つのリガンドに結合されていることを特徴とする、請求項15記載の複合ナノスフェアから由来する複合体。

【請求項17】 とりわけ請求項1から15のいずれか一項記載の少なくとも一つのリガンド、または請求項16記載の複合体を含む試薬。

【請求項18】 とりわけ請求項17記載の試薬を含む診断用組成物。

【請求項19】 診断試験における、請求項17記載の試薬または請求項18記載の組成物の使用。

【請求項20】 医薬物質、アンチセンスプローブ、遺伝子修復試薬、または治療上興味ある遺伝子、タンパク質の活性をブロックまたは阻害する薬剤から選択される少なくとも一つのリガンドに結合されていることを特徴とする、請求項1から14のいずれか一項記載の複合ナノスフェアから由来する複合体。

【請求項21】 とりわけ請求項20記載の複合体を含むことを特徴とする

、治療用または予防用組成物。

【請求項22】 治療用または予防用組成物の調製のための、請求項20記載の複合体の使用。

【請求項23】 ケージ分子、キレート剤、および触媒から選択される少なくとも一つのリガンドに結合されていることを特徴とする、請求項1から13のいずれか一項記載の複合ナノスフェアから由来する複合体。

【請求項24】 (i)二つの混和しない相からなる安定な等分散性開始エマルションを入手し、ここで疎水性A相は、界面活性剤を含む有機相に均一に分散した無機ナノ粒子を含む小滴からなり、前記A相は、親水性B相に分散しており、(ii)少なくとも一つの水溶性モノマー、少なくとも一つの水溶性架橋剤、および少なくとも一つの水溶性重合開始剤を、親水性B相に導入し、水溶性モノマーを、架橋剤と開始剤の存在下で重合させる、複合ナノスフェアの調製方法。

【請求項25】 工程(ii)の前に、少なくとも一つの水溶性モノマーと第一の重合開始剤を親水性相内に導入し、もし必要であれば、第二の重合開始剤を工程(ii)で導入する、請求項24記載の方法。

【請求項26】 前記第一の水溶性重合開始剤、および任意に第二の重合開始剤が、水溶性および疎水性モノマーのそれぞれの添加と同時に、または水溶性および疎水性モノマーのそれぞれの添加の前または後にのいずれかで、親水性相内に導入される、請求項24または25記載の方法。

【請求項27】 前記水溶性開始剤が、過硫酸カリウム、過硫酸ナトリウムおよび過硫酸アンモニウムのような、過硫酸塩と称されるパーオキシジスルファート塩；ヒドロ過酸化クメンのようなヒドロ過酸化物；過酸化水素；塩酸2,2'-アゾビスアミジノプロパン、ジメチル2,2'-アゾビス(2-メチルプロピオナート)、4,4'-アゾビス(4-シアノ吉草酸)、および2,2'-アゾビス(2-シアノプロパノール)から選択される、請求項24から26のいずれか一項記載の方法。

【請求項28】 前記水溶性モノマーが、特にN-イソプロピルアクリルアミド、N-メチルアクリルアミド、N-エチルメタクリルアミド、N-n-プロピルアクリルアミド、N-n-プロピルメタクリルアミド、N-イソプロピルメタクリルアミド、N-シクロプロピルアクリルアミド、N,N-ジエチルアクリルアミド、N-メチル-N-

イソプロピルアクリルアミド、N-メチル-N-n-プロピルアクリルアミドといったN-アルキルアクリルアミドおよびN-N-ジアルキルアクリルアミドから選択され、前記疎水性モノマーが、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、tert-ブチルスチレン、ビニルトルエンのような水中で不溶性であるビニル芳香族モノマー、並びにこれらのモノマーと、互いのおよび／またはアルキル基が3から10の炭素原子を含むアルキルアクリレートおよびアルキルメタクリレート、および4または5の炭素原子を有するエチレン性酸と1から8の炭素原子を有するアルキルとのエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体、ジエン化合物のような他のコモノマーとのコポリマーから選択されることを特徴とする、請求項24から26のいずれか一項記載の方法。

【請求項29】 前記疎水性モノマーが、スチレン、メチルスチレン、エチルスチレン、tert-ブチルスチレン、ビニルトルエンのような水中で不溶性であるビニル芳香族モノマー、並びにこれらのモノマーと、互いのおよび／またはアルキル基が3から10の炭素原子を含むアルキルアクリレートおよびアルキルメタクリレート、および4または5の炭素原子を有するエチレン性酸と1から8の炭素原子を有するアルキルとのエステル、メタクリル酸、スチレン誘導体、ジエン化合物のような他のコモノマーとのコポリマーから選択されることを特徴とする、請求項24記載の方法。

【請求項30】 前記水溶性架橋剤が、N,N'-メチレンビスアクリルアミド(MBA)およびエチレングリコールジメタクリレートから選択される、請求項24から29のいずれか一項記載の方法。

【請求項31】 前記疎水性有機A相が、5から12の炭素原子を含む化合物から選択される脂肪族または環状炭化水素、それらの異性体、およびそれらの混合物を含む相であり、特にペンタン、ヘキサン、ヘプタン、オクタン、ノナン、デカン、ウンデカン、ドデカンから選択され、B相が、水性相、特に水である、請求項24から30のいずれか一項記載の方法。

【請求項32】 前記重合が、重合開始剤の存在下で、約60℃から約90℃まで、好ましくは約70℃まで温度を上昇させることによって、またはUV光線若しくはレーザービームのような光線を使用して光化学的に実施されることを特徴とす

る、請求項24から31のいずれか一項記載の方法。

【国際調査報告】

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.
PCT/FR 00/03085

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 G01N33/543 G01N33/546

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 G01N A61K C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, WPI Data, BIOSIS, COMPENDEX, INSPEC, CHEM ABS Data

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 4 358 388 A (DANIEL JEAN-CLAUDE ET AL) 9 November 1982 (1982-11-09)	19-27
A	examples 1,2	1-18
X	EP 0 390 634 A (RHONE-POULENC CHIMIE) 3 October 1990 (1990-10-03)	19-27
A	cited in the application	1-18
A	example 1	1-27
A	WO 99 19000 A (UNIV NEW YORK) 22 April 1999 (1999-04-22)	1-27
A	examples 1-6	1-27
A	EP 0 180 384 A (TECHNICON INSTR) 7 May 1986 (1986-05-07)	1-27
	page 2, line 13 - line 35 page 7, line 23 - page 8, line 15 claims 1,9,10	
	— / —	

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the international filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
- *Z* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 March 2001

Date of mailing of the international search report

26/03/2001

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5618 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 apo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Hart-Davis, J

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Int. Application No. PCT/FR 00/03085

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 4 342 739 A (KAKIMI FUJIO ET AL) 3 August 1982 (1982-08-03) claims 1,34,35	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR 00/03085

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 4358388 A	09-11-1982	FR 2480764 A	23-10-1981
		AT 9587 T	15-10-1984
		AU 539397 B	27-09-1984
		AU 6961881 A	22-10-1981
		BR 8102333 A	15-12-1981
		CA 1159247 A	27-12-1983
		DE 3166260 D	31-10-1984
		DK 171881 A	19-10-1981
		EP 0038730 A	28-10-1981
		ES 501397 D	16-02-1982
		ES 8203097 A	01-06-1982
		IE 51322 B	10-12-1986
		IL 62649 A	31-10-1984
		JP 1726739 C	19-01-1993
		JP 4003088 B	22-01-1992
		JP 56164503 A	17-12-1981
EP 0390634 A	03-10-1990	FR 2645160 A	05-10-1990
		AT 122704 T	15-06-1995
		AU 5239690 A	04-10-1990
		CA 2013459 A	30-09-1990
		DE 69019411 D	22-06-1995
		DE 69019411 T	09-11-1995
		ES 2072996 T	01-08-1995
		JP 2286729 A	26-11-1990
		JP 2623358 B	25-06-1997
		NQ 178376 B	04-12-1995
		US 5356713 A	18-10-1994
WO 9919000 A	22-04-1999	AU 9691298 A	03-05-1999
EP 0180384 A	07-05-1986	AU 595165 B	29-03-1990
		AU 4902985 A	08-05-1986
		CA 1314769 A	23-03-1993
		DE 3582649 D	29-05-1991
		JP 2554250 B	13-11-1996
		JP 61181967 A	14-08-1986
		US 5206159 A	27-04-1993
US 4342739 A	03-08-1982	JP 1619364 C	30-09-1991
		JP 55094636 A	18-07-1980
		JP 62017709 B	18-04-1987
		JP 1408182 C	27-10-1987
		JP 56072346 A	16-06-1981
		JP 62017710 B	18-04-1987
		JP 56072347 A	16-06-1981
		JP 62019703 B	30-04-1987
		DE 3000483 A	17-07-1980
		GB 2041517 A,B	10-09-1980

フロントページの続き

(51)Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	ターコード [*] (参考)
A 6 1 K 47/32		A 6 1 K 47/32	
47/48		47/48	
48/00		48/00	
A 6 1 P 43/00	1 0 5	A 6 1 P 43/00	1 0 5
G 0 1 N 33/545		G 0 1 N 33/545	A
// C 0 9 D 11/00		C 0 9 D 11/00	
(81)指定国 EP(AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OA(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG), AP(GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), EA(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW			
(72)発明者	アブデルハミド・エレサリ		
	フランス・F-69007・リヨン・リュ・ジャック・モノ・7		
(72)発明者	エリック・ボスク		
	フランス・F-33770・サル・シュマン・ドウ・ブランケット・34		
(72)発明者	クリスチャン・ピショ		
	フランス・F-69960・コルバ・アレ・ローラン・ガロ・5		
(72)発明者	ベルナール・マンドラン		
	フランス・F-69100・ヴィルバンヌ・リュ・ドウ・ラ・ドウア・21		
(72)発明者	ジェローム・ビベトウ		
	フランス・F-33000・ボルドー・リュ・ブロン・16		

Fターム(参考) 4C076 AA65 AA95 CC26 CC29 DD21
DD28A DD34H EE13H FF43
GG27
4C084 AA13 AA17 NA10 NA13 ZB211
ZB212
4C086 AA01 AA02 BC57 GA04 GA07
MA01 MA04 NA10 NA13 ZB21
4J039 AB07 AD02 AD03 AD09 AD10
AD12 BA04 BA06 BA07 BA13
BA21 BA23 BA31 BA32 BA35
BA37 BA38 BA39 BD04 BE12
BE26 BE27 CA03 CA06 EA44